

· 临床研究 ·

TLR5 基因多态性与幽门螺旋杆菌感染的关联性

高 芳¹, 卫星如², 马立聪^{2,3}, 田旭阳³, 党 彤^{3*}, 贾彦彬^{2,3*}¹包头医学院医学技术学院, ²基础医学与法医学院, 内蒙古 包头 014060; ³包头医学院第二附属医院内蒙古消化病研究所, 内蒙古 包头 014030

[摘要]目的:采用标记单核苷酸多态性(Tag-single nucleotide polymorphism, Tag-SNP)途径,探讨TLR5基因多态性与幽门螺旋杆菌感染的关联性。方法:在281例研究样本中,采用TaqMan法对4个Tag-SNP进行基因分型;使用Haploview软件构建单体型,同时运用非条件性Logistic回归计算比值比(odds ratios, OR)及其95%可信区间(confidence intervals, CI),评估各等位基因、基因型及单体型与幽门螺旋杆菌感染的关系。结果:包头地区汉族人群中TLR5 rs17163737与幽门螺旋杆菌感染相关联,相对于携带等位基因G的人群,携带等位基因T的人群幽门螺旋杆菌感染的风险可提高1.578倍(T vs. G: OR=1.578, 95% CI=1.069~2.330);与携带GG基因型的人群比较,TT基因型携带者幽门螺旋杆菌感染的风险增高(TT vs. GG: OR=3.336, 95% CI=1.024~9.244);其余SNP位点均与幽门螺旋杆菌感染无关联($P>0.05$)。同时,TLR5基因 rs34270714-rs5744174-rs851139-rs17163737之间存在强连锁不平衡,构成单体型区域;单体型分析结果显示各单体型与幽门螺旋杆菌感染没有关联($P>0.05$)。结论:TLR5 rs17163737基因多态性可能在幽门螺旋杆菌感染中发挥了一定作用。

[关键词] TLR5; 基因多态性; 幽门螺旋杆菌感染**[中图分类号]** R394.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1350-03**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190918

目前,世界上超过一半的人口感染幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)。近些年,发展中国家Hp感染率仍居高不下^[1-2]。Hp感染后可引起宿主胃萎缩,并使其逐渐发展成癌前病变直至胃癌^[3-4]。Toll样受体家族(Toll-like receptor, TLR)是一种受体蛋白,能通过识别细菌、病毒等病原体的相关分子模式,在抗病原微生物免疫防御反应中起重要作用。然而,10%~20%的Hp感染者会发展成消化性溃疡,仅有1%~2%会发展成为胃癌^[5],提示宿主的遗传因素在胃癌发生发展过程中发挥了重要作用,一些单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与胃癌的遗传易感性关联^[6]。研究显示:个体对TLR配体的正确应答与TLR基因的多态性有关,因此导致了个体对一些炎症性疾病的易感性不同。本研究采用标记单核苷酸多态性(Tag-single nucleotide polymorphism, Tag-SNP)的方法在中国包头地区汉族人群中,

检测TLR5基因多态性与Hp感染的关系,旨在为感染Hp后相关疾病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选择2008年9月—2010年6月在包头医学院第一附属医院的体检人群作为研究样本^[7-8],共281例,其中男220例,女61例,年龄(59.10±11.57)岁(26~85岁)。所有研究对象均为在包头居住了5年以上的汉族人群,均无癌症病史和明显的胃部疾病,签署了知情同意书,并提供血液标本2 mL。此项研究已获得包头医学院伦理委员会的批准。

实验材料包括:人抗Hp-CSAs IgG抗体试剂盒(Biohit公司,芬兰);人血液基因组DNA提取试剂盒(北京天根公司);TaqMan基因分型的引物、探针均由美国Applied Biosystems公司设计并合成。

1.2 方法

1.2.1 Hp感染检测

采用酶联免疫吸附法检测样本血清中抗Hp-CSAs IgG抗体。严格按照说明书操作并判断结果,即Hp IgG抗体滴度 ≥ 30 EIU,判断Hp感染为阳性。

[基金项目] 国家自然科学基金(30960169, 81250024, 81650017);内蒙古自然科学基金(2016MS0805, 2017MS(LH)0807);包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-DF 201603)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jyb690318@hotmail.com; dtong999@sina.com

1.2.2 SNP选择和基因分型

根据 HapMap 数据库 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) 中国人的资料, 使用 Algorithm-Tagger-pair-wise Tagging 软件筛选目标 Tag-SNP, 其中最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) $\geq 5\%$ 、 $r^2 > 0.8$ 作为纳入标准。最终筛选出 5 个 SNP: rs34270714、rs5744174、rs851139、rs2241097、rs17163737。采用 TaqMan 法在所有样本中对筛选出的 5 个 SNP 进行基因分型, 成功率均大于 98%。

1.3 统计学方法

数据分析使用 SPSS16.0 统计软件进行。用 χ^2 检验检测样本中的基因型分布是否遵循 Hardy-Weinberg 平衡; 使用 Haploview 4.0 软件对 SNP 位点进行连锁不平衡分析, 并采用 D' 置信区间法划分单体型块(LD block)。用非条件性 Logistic 回归计算比值比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(confidence interval, CI), 评价各等位基因、基因型以及单体型与 Hp 感染的关联性, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 单个 SNP 位点与 Hp 感染的关系

在研究样本中, SNP rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$); 而 SNP rs2241097 的基因型分布不符合 Hardy-weinberg 平衡定律, 在后续分析中被剔除。统计分析结果显示, SNP rs17163737 与 Hp 感染相关联: 相对于携带等位基因 G 的人群, 携带等位基因 T 的人群 Hp 感染的风险可提高 1.578 倍(T vs. G: OR=1.578, 95% CI=1.069~2.330); 与携带 GG 基因型的人群比较, TT 基因型携带 Hp 感染的风险增高(TT vs. GG: OR=3.336, 95% CI=1.024~9.244); 其余 SNP 位点均与 Hp 感染无关联($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 TLR5 基因的单体型与 Hp 感染的关系

对 TLR5 基因的不同位点进行连锁不平衡分析, 发现 rs34270714 - rs5744174 - rs851139 - rs17163737 之间存在强连锁不平衡, 构成单体型区域。单体型分析结果显示各单体型与 Hp 感染没有关联($P > 0.05$, 表 2)。

3 讨 论

Hp 是螺旋形、微需氧、有鞭毛的革兰氏阴性菌, 选择性地寄居在胃上皮细胞和胃黏膜层^[9]。现已证实, Hp 感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌等上消化道疾病的主

表 1 SNP 与幽门螺旋杆菌感染风险的关系

SNP	等位基因/基因型	Hp 阳性 [n(%)]	Hp 阴性 [n(%)]	OR(95% CI) ^a
rs34270714	G	208(86.7)	265(85.5)	1
	A	32(13.3)	45(14.5)	0.910(0.561~1.477)
	GG	90(75.0)	114(73.6)	1
	AG	28(23.3)	37(23.8)	0.956(0.549~1.697)
	AA	2(1.7)	4(2.6)	0.623(0.111~3.489)
rs5744174	T	190(79.2)	253(81.6)	1
	C	50(20.8)	57(18.4)	1.166(0.767~1.773)
	TT	75(62.5)	105(67.8)	1
	CT	40(33.3)	43(27.7)	1.306(0.772~2.208)
	CC	5(4.2)	7(4.5)	1.010(0.308~3.317)
rs851139	G	191(78.9)	256(81.5)	1
	A	51(21.1)	58(18.5)	1.184(0.777~1.804)
	GG	74(61.2)	106(67.5)	1
	AG	43(35.5)	44(28.0)	1.405(0.839~2.355)
	AA	4(3.3)	7(4.5)	0.832(0.234~2.952)
rs17163737	GG	0(0.0)	2(1.3)	—
	G	169(71.0)	246(79.9)	1
	T	69(29.0)	62(20.1)	1.578(1.069~2.330)
	GG	63(53.0)	98(63.6)	1
	GT	43(36.1)	50(32.5)	1.343(0.800~2.255)
	TT	13(10.9)	6(3.9)	3.336(1.204~9.244)

由于有缺失的数据, 因此基因型之和不及样本的等位基因总数。a: 平衡了性别和年龄因素。

表 2 单体型与幽门螺旋杆菌感染风险的关系

单体型*	Hp 阳性(%)	Hp 阴性(%)	OR(95% CI)
GTGG	49.3	59.9	1
GTGT	28.8	20.2	1.769(0.989~3.165)
ACAG	12.8	13.3	1.119(0.535~2.340)
GCAG	8.3	5.5	1.741(0.669~4.533)

*SNP 顺序为 rs34270714-rs5744174-rs851139-rs17163737。

要致病因素^[10-11]。

TLR 属于跨膜识别受体家族, 在哺乳动物中已发现了 15 种 TLR^[12], TLR 的表达和激活具有特异性, TLR5 在胃中可特异性地表达。大量研究表明, TLR5 能从入侵的细菌中识别细菌鞭毛蛋白, 与 Hp 感染关系密切^[13-14]。López-Yglesias 等^[15]在研究鞭毛细菌的致病过程中发现, 细菌的鞭毛蛋白能够被 TLR5 识别且通过 MyD88 信号通路激活免疫应答, 增强 T 细胞与 B 细胞的免疫应答能力。由此推测 Hp 也能够通过其自身的鞭毛蛋白与 TLR5 作用发挥免疫调节功能, Mori 等^[16]已经在细胞方面研究中证实了这一点。一项研究显示: TLR5 rs5744174 多态

性与Hp感染之间存在关联^[17]。这些结果提示,TLR基因可能与Hp感染及其导致的胃癌发生有关,是研究胃癌发病风险的重要候选基因。

TLR5位于1q41,包含6个外显子。越来越多的证据显示,个体对TLR配体的正确应答与TLR基因的多态性有关,从而导致了个体对一些炎症性疾病的易感性不同^[18]。TLR5功能异常与胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌的发生有关^[19]。同时,研究也显示TLR5基因的遗传变异可能和Hp相互作用,影响胃癌的发病风险^[20]。然而,同一个SNP在不同人群中对疾病的发病风险所起的作用可能不同。因此,本研究采用TaqMan法探讨了TLR5基因多态性与Hp感染的关系。结果显示:包头地区汉族人群中TLR5 rs17163737与Hp感染关联:相对于携带等位基因G的人群,携带等位基因T的人群Hp感染的风险可提高1.578倍;与携带GG基因型的人群比较,TT基因型携带者Hp感染的风险增高。当然,本研究仅涵盖281例研究对象,尚需进一步扩大样本量以获得更为客观正确的结果。

[参考文献]

[1] Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (36) : 12781-12808

[2] 李勤琴. 幽门螺旋杆菌感染与非消化系统疾病关系[D]. 重庆:重庆医科大学,2015

[3] Servetas SL, Bridge DR, Merrell DS. Molecular mechanisms of gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori* [J]. Curr Opin Infect Dis, 2016, 29 (3) : 304-310

[4] 陈帅印,李 军,张荣光,等. 从幽门螺杆菌致病机制中看病因与病因推断中的辩证思维[J]. 医学与哲学(B), 2017, 38(7):75-76,79

[5] Cao P, McClain MS, Forsyth MH, et al. Extracellular release of antigenic protein by *Helicobacter pylori* [J]. Infect Immun, 1998, 66(6):2984-2986

[6] Mommersteeg MC, Yu J, Peppelenbosch MP, et al. Genetic host factors in *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis: Emerging new paradigms [J]. Biochim Biophys Acta, Rev cancer, 2018, 1869(1):42-52

[7] Zhou CJ, Zhang LW, Fang G, et al. Common genetic variations in the MUC5AC gene are not related to *Helicobacter pylori* serologic status [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(24):10719-10722

[8] 高 芳,马立聪,董文杰,等. ITGA1基因多态性与幽门螺旋杆菌感染的关联性分析[J]. 吉林大学学报(医学

版),2018,44(6):1275-1279

[9] Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 325(16):1127-1131

[10] He CY, Chen MY, Liu JW, et al. Host genetic factors respond to pathogenic step-specific virulence factors of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis [J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2014, 759:14-26

[11] 成秀梅,杨留才,宋 署,等. 盐城市幽门螺旋杆菌感染及 vac A 和 cag A 基因型的流行特征及其与常见胃肠疾病的关系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2018, 38(5):691-695

[12] 吴 迪,刘玉芬,唐敬洁. Toll样受体及其与细菌感染性疾病关系的研究进展[J]. 中国家禽,2016,38(17): 50-52

[13] Grimm M, Munz A, Exarchou A, et al. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* without association of TLR5 expression in oral squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(1):35-44

[14] Melit LE, Marginean CO, Marginean CD, et al. The relationship between Toll-like receptors and *Helicobacter pylori*-related gastropathies: still a controversial topic [J]. J Immunol Res, 2019:8197048

[15] Lopez-Yglesias AH, Zhao XD, Quarles EK, et al. Flagellin induces antibody responses through a TLR5 - and inflammasome - independent pathway [J]. J Immunol, 2014, 192(4):1587-1596

[16] Mori J, Vranac T, Smrekar B, et al. Chimeric flagellin as the self-adjuncting antigen for the activation of immune response against *Helicobacter pylori* [J]. Vaccine, 2012, 30 (40):5856-5863

[17] Zeng HM, Pan KF, Zhang Y, et al. Genetic variants of Toll-like receptor 2 and 5, *Helicobacter pylori* infection, and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20 (12):2594-2602

[18] Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, et al. Expression and subcellular distribution of Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136 (3) : 521-526

[19] Husseinzadeh N, Davenport SM. Role of Toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: a review [J]. Gynecol Oncol, 2014, 135(2):359-363

[20] Xu TW, Fu DQ, Ren Y, et al. Genetic variations of TLR5 gene interacted with *Helicobacter pylori* infection among carcinogenesis of gastric cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8 (19):31016-31022

[收稿日期] 2019-01-16